

# PTO 2003-3244

S.T.I.C. Translations Branch

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-135957

(43) 公開日 平成7年(1995)5月30日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 1/00	A			
B 0 1 D 15/08				
C 1 2 M 3/00	Z			
C 1 2 N 5/06		8412-4B	C 1 2 N 5/ 00	E
			審査請求 未請求	請求項の数 1 OL (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平5-288906

(22) 出願日 平成5年(1993)11月18日

(71) 出願人 000109543  
テルモ株式会社  
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72) 発明者 大西 誠人  
神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地  
テルモ株式会社内

(54) 【発明の名称】 細胞分離用材料

(57) 【要約】

【目的】 標的物質に対する高い特異性を有し細胞を簡便に回収できる分離用材料及び分離システムを提供することを目的とする。

【構成】 標的物質に対して特異的親和性を有する物質を結合した刺激応答性高分子鎖と非刺激応答性の水溶性高分子鎖とを表面に担持させたことを特徴とする細胞分離材料。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的物質に対して特異的親和性を有する物質を結合した刺激応答性高分子鎖と非刺激応答性の水溶性高分子鎖とを少なくとも表面に担持させたことを特徴とする細胞分離用材料。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、標的物質に対して特異的親和性を有する物質と刺激応答性高分子とを利用した新規な細胞分離用材料及び分離システムに関する。

## 【0002】

【従来の技術】 近年、細胞工学や遺伝子工学等の発展に伴い、細胞や遺伝子を利用した細胞治療や遺伝子治療の研究が盛んとなっており、目的とした細胞や生体物質を損傷させることなく分離する技術が重要となっている。また、バイオテクノロジーの発展により、生物工学的手法によるペプチド、蛋白質、糖蛋白質類といった生理活性分子の生産が行われるようになってきており、細胞やバイオプロダクツの簡便で損傷の少ない分離精製技術が望まれている。

【0003】 従来より化学工業分野で使用されている吸着・分配・蒸留・析出といった分離・精製の単位操作では、熱や有機溶媒の添加などにより、被精製物質に対して大幅な環境変化を強いるため、前述の細胞やバイオプロダクツの分離には適していないことが多い。

【0004】 細胞やバイオプロダクツの分離方法として、体積（分子量）や密度による方法（沈降速度法、密度勾配遠心法、ゲル濾過法など）、電場中での移動度の差による方法（電気泳動など）、等電点による方法（焦点電気泳動など）、2液相間への分配による方法（2層分配法、分配クロマトグラフィー）、固相への吸着性の差による方法（吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー）などが知られている。

【0005】 これらの分離方法の多くは、物理化学的性状が大きく異なる細胞成分の分離には適用できるものの、物理化学的性状が良く似た成分や細胞、例えばリンパ球亜集団の分離などには適用が困難であった。この中で標的物質に対する選択性の高い方法は、アフィニティークロマトグラフィーであり、近年広く利用されるようになってきている。細胞を対象とするアフィニティークロマトグラフィーとしては、標的細胞の表層に存在する膜蛋白等に対するモノクローナル抗体を結合したビーズやシャーレを用いた分離方法が報告されており、本方法による各種リンパ球の亜集団分離も報告されている（例えば、ジャーナル・オブ・イミュノロジカル・メソッド、第54号、251ページ、1983年に記載されているブラウンらの研究報告）。この抗体を用いた方法は、特異性が極めて高いことで利点であるが、欠点として、吸着した細胞の脱着が困難なこと、抗体が細胞表層の抗原に結合するための時間（接触時間）を長くする必

要があること、その結果、非特異的な吸着が増加することなどがあった。

【0006】 前述の欠点を改良した方法としては、アビジン-ビオチンのような親和性の高い結合を利用して、短時間で分離材料に吸着させる方法が国際出願（WO91/16116）で提案されている。すなわち、ビオチンで標識した抗体を予め時間をかけて標的細胞に結合させた後、アビジンを結合した分離材料に吸着させることにより、短時間で効率良く標的細胞を分離できることとなる。しかしながら、この方法では、標的細胞の回収が、物理的振動によりアビジン-ビオチン結合を解離することにより行われているため、ビーズ同士の衝突による細胞の損傷や機能低下が免れない。

【0007】 細胞機能を損なわないように回収する方法としては、特開平2-211865号に記載された水に対する上限または下限臨界溶解温度が0～80℃にあるポリマーもしくはコポリマーで表面を被覆した細胞培養基材が報告されている。この方法は、温度により疎水性-親水性と相転移する温度応答性高分子を利用したものであり、温度応答性高分子が疎水性で収縮した状態の時に細胞を吸着させた後、温度を変化させ、親水性となって膨潤するときに吸着した細胞を脱着させる方法である。この方法の欠点は、細胞に対する特異性が低いため、種々の細胞が存在する液体から特定の細胞を回収することができないことである。特に、マクロファージ、白血球、リンパ球などの多くは、曲率の小さい表面に吸着することがしられており、フィルターや不織布形状に加工したこの分離材料を用いて、特定のリンパ球などを選択的に回収することは不可能であった。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明は、標的物質に対する高い特異性を有し細胞を簡便に回収できる分離用材料及び分離システムを提供することを目的とする。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】 上記発明の目的は以下のアフィニティークロマトグラフィー及び分離方法によって達成される。

【0010】 (1) 標的物質に対して特異的親和性を有する物質を結合した刺激応答性高分子鎖と非刺激応答性の水溶性高分子鎖とを表面に担持させたことを特徴とする分離用材料。

(2) 標的物質に対して特異的親和性を有する物質を結合した刺激応答性高分子鎖と非刺激応答性の水溶性高分子鎖とを表面に担持させた分離用材料を用いて、標的物質を該分離材料に結合させた後、刺激応答性高分子の高次構造を変化させることにより、標的物質を該分離材料より脱離させることを特徴とする分離方法。

【0011】 本発明において、標的物質は特に限定されないが、機能維持が重要であり分離が困難な細胞、例え

ば、上皮系細胞、肝実質細胞、脾ラ島細胞、マクロファージ、単核球、NK細胞(CD56<sup>+</sup>)、血液幹細胞などの未分化細胞(CD34<sup>+</sup>)、Bリンパ球、Tリンパ球、及びそのサブセット(CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD71<sup>+</sup>、IL2R<sup>+</sup>など)、腫瘍細胞などを好適に例示できる。標的物質に対して特異的親和性を有する物質とは、抗原-抗体、酵素-基質(阻害剤)、細胞表面のレセプターとの反応などの生体の制御機構で見られる特異的親和性を例示できる。

【0012】刺激応答性高分子とは、熱、PH、電位、光などにより高次構造が変化して、水溶液中で膨潤したり収縮する高分子であればよい。例えば、水に対する上限臨界温度または下限臨界温度を有し、温度変化にตอบสนองして、膨潤-収縮する高分子を好適に例示できる。そのような高分子としては、N-イソプロピルアクリルアミドやN、N-ジエチルアクリルアミド、N-イソプロピルメタアクリルアミドなどのアクリルアミドやメタアクリルアミドの誘導体類をはじめ、ビニルメチルエーテルなどのビニルエーテル類などのポリマーやコポリマーを例示できる。

【0013】光応答性の場合、例えば、アゾベンゼン基を有する吸水性高分子のように光異性化をおこす高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリルアミド系単量体との共重合体のように光イオン解離する感応基を有する吸水性高分子、スピロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリルアミドゲルのように疎水性相互作用が光変化する高分子などを用いることができる。

【0014】標的物質に対して特異的親和性を有する物質の刺激応答性高分子への結合は、公知の化学反応を用いた方法で達成できるが、両者の結合の間に、スパーサーや2種以上の化合物よりなる結合が存在していてもよい。そのような結合としては、生理的条件で高い親和性を有するビオチン-アビジン、ビオチン-ストレプトアビジン、リボフラビン-リボフラビン結合蛋白などの組み合わせを好適に例示できる。ビオチン-アビジンの組み合わせは、ビオチン標識抗体などが市販されており容易に入手できるため、容易にアビジンを導入した刺激応答性高分子鎖に結合させることができる。

【0015】標的物質に対して特異的親和性を有する物質を結合した刺激応答性高分子鎖を材料表面に担持させる方法は、公知の方法でかまわない。例えば、官能基を有する単量体を共重合した刺激応答性高分子を合成した後、該官能基を利用して、直接あるいは縮合剤や架橋剤を用いて材料表面に担持したり、標的物質に対して特異的親和性を有する物質を結合したりすることができる。また、電子線・オゾン・γ線・プラズマなどを利用したグラフト法により官能基を有する単量体を共重合した刺激応答性グラフト鎖を形成させた後、標的物質に対して特異的親和性を有する物質を結合させてもかまわない。

疎水性高分子とのブロックコポリマーとして、基材表面にコーティングして担持してもよい。非刺激応答性の水溶性高分子鎖とを表面に担持させる方法についても、同様に公知の方法を適用することができる。好ましくは、刺激応答性高分子鎖が分岐や架橋が少ない直鎖状の高分子として存在している方が、分子の構造変化が大きくなるため望ましい。

【0016】分離材料の形態は、特に限定されず、プレート状、シャーレ状、繊維状、不織布状、多孔質膜、多孔質フィルター、ビーズなどを例示でき、それぞれの形態にあったカラムなりモジュールに収納されて使用されてもかまわない。また、その基材となる材質についても水に対して非溶解性であれば特に限定されず、ポリオレフィン、ハロゲン化ポリオレフィン、ポリウレタン、ポリアミド、ポリエステル、綿、ポリスチレン、及びそれらの変性物や共重合体など、既存の材料を例示することができる。

【0017】分離材料に吸着した標的物質の回収は、温度等の刺激により刺激応答性高分子の高次構造を急速に変化せしめることによりおこなう。標的物質に結合した特異的親和性を有する物質は、刺激応答性高分子鎖の収縮に伴って分離材内部側に移動するものと推定され、標的物質から解離することとなる。標的物質と刺激応答性高分子の間に2種以上の化合物よりなる弱い結合が存在する場合、その結合を解離することによって、標的物質を脱離させてもかまわない。回収率の向上などを目的として、必要に応じて物理的な方法や化学的な方法を併用してもかまわない。

【0018】本発明の分離材料は、刺激応答性高分子が緩衝液、培養液、血液、血漿などで膨潤した状態で標的物質を特異的に吸着させた後、温度等を変化させて刺激応答性高分子鎖を急速に収縮させて、標的物質を分離材料より脱離させる方法であるから、細胞やタンパク質などの非特異的吸着を抑制できることとなる。また、非刺激応答性の水溶性高分子が共存しているため、刺激応答性高分子鎖が収縮した状態においても、解離した標的物質の材料表面への再吸着などが起こりにくくなる。さらに、非刺激応答性の水溶性高分子は、刺激応答性高分子鎖が収縮する際に、吸着した細胞等の標的物質が収縮する高分子鎖に伴って移動するのを妨げることとなり、脱離を促進するものと考えられる。

【0019】以上のように、本発明の分離材料は、標的物質に対する特異的親和性を有するリガンドと刺激応答性高分子とを有しているため、標的物質を選択的に吸着し、刺激応答性高分子の高次構造変化により、該標的物質を簡便に脱離できる分離材料や分離システムとなる。

【0020】

【実施例】

(実施例1) 標的物質としてCD34<sup>+</sup>細胞を設定し、

標的物質に対して特異的親和性を有する物質としてCD

5

34に対する抗体、刺激応答性高分子としてポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を用いて分離用吸着材料を作製し、CD34<sup>+</sup>細胞の分離を行った。

【0021】主鎖にパーオキサイド基を有するポリブチルメタクリレートと重合開始剤として、N-イソプロピルアクリルアミドとメタクリル酸とを重合させ、ブチルメタクリレートと疎水性ドメイン、N-イソプロピルアクリルアミドとメタクリル酸との共重合体(モル比2:2:1)を温度応答性ドメインとするブロック共重合体を合成した。また、非刺激応答性の水溶性高分子としてポリ(N,N-ジメチルアクリルアミド)を選定し、主鎖にパーオキサイド基を有するポリブチルメタクリレートを重合開始剤として、N,N-ジメチルアクリルアミドを重合し、疎水性ドメインとしてポリ(ブチルメタクリレート)、水溶性ドメインとしてポリ(N,N-ジメチルアクリルアミド)を有するブロックコポリマーを合成した。これらの2種類のブロック共重合体を、1:1の割合でクロロホルム-エタノール(9:1)の混合溶媒に溶解し、プラズマ放電処理した厚さ100 $\mu$ mのポリエステル不織布にコーティングした。続いて、この不織布を $\phi$ 25mmに打ち抜いて容器に入れ、5mg/mlの1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(シグマ社製)溶液を20ml(pH5.5)シャーレに注入し、5分間室温で放置した。続いて、CD34抗体の10mg/ml溶液を1ml添加し、室温で1時間時々攪拌しながら放置した。さらに、グリシンを最終濃度で0.2モルとなるように添加して1時間放置した後、リン酸バッファー(PBS)でリンスすることにより本発明の分離材料を得た。

【0022】この分離用不織布を5枚積層して $\phi$ 25mmのフィルターホルダーにセットして、骨髓のバフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液( $1 \times 10^6$ /ml)を、定量ポンプで0.5ml/minで流した。吸着した細胞の溶出は、温度を35℃に上昇させ、1%アルブミンを添加したPBSを流すことで行った。その結果、純度97%、回収率53%でCD34<sup>+</sup>細胞を回収することができた。

【0023】(実施例2)標的物質としてCD4<sup>+</sup>細胞を設定し、標的物質に対して特異的親和性を有する物質としてCD4に対する抗体、刺激応答性高分子としてポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を選定して、分離用吸着材料を作製し、CD4<sup>+</sup>細胞の分離を行った。

【0024】主鎖にパーオキサイド基を有するポリブチルメタクリレートを重合開始剤として、N-イソプロピルアクリルアミドとメタクリル酸とを重合させ、ブチルメタクリレートと疎水性ドメイン、N-イソプロピルアクリルアミドとメタクリル酸との共重合体(モル比2:2:1)を温度応答性ドメインとするブロック共重合体

6

を合成した。また、非刺激応答性の水溶性高分子としてポリ(N,N-ジメチルアクリルアミド)を選定し、主鎖にパーオキサイド基を有するポリブチルメタクリレートを重合開始剤として、N,N-ジメチルアクリルアミドを重合し、疎水性ドメインとしポリ(ブチルメタクリレート)、水溶性ドメインとしてポリ(N,N-ジメチルアクリルアミド)を有するブロックコポリマーを合成した。これらの2種類のブロック共重合体を、1:1の割合で、クロロホルム-エタノール(9:1)の混合溶媒に溶解し、プラズマ放電処理した厚さ100 $\mu$ のポリエステル不織布にコーティングした。続いて、この不織布を $\phi$ 25に打ち抜いて容器に入れ、5mg/mlの1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(シグマ社製)溶液を50ml(pH5.5)シャーレに注入し、5分間室温で放置した。続いて、アビジンの10mg/ml溶液を2ml添加し、室温で1時間時々攪拌しながら放置した。さらに、グリシンを最終濃度で0.2モルとなるように添加して1時間放置した後、リン酸バッファー(PBS)でリンスした。このアビジン固定化不織布は、PBS中で4℃で保存した。CD4<sup>+</sup>細胞とアビジンに特異的に吸着する物質として、ビオチン標識したCD4抗体を購入(イムノテック)し、アビジン固定化不織布にPBS中でインキュベートすることにより結合させ、本発明の分離材料を得た。

【0025】この分離用不織布を5枚積層して $\phi$ 25mmのフィルターホルダーにセットして、人新鮮血のバフィーコートより採取し1%アルブミンを添加したPBSで洗浄して調整した白血球液( $1 \times 10^6$ /ml)を25℃で10ml流すことにより分離用不織布に吸着させた。吸着した細胞の溶出は、温度を35℃に上昇させ、1%アルブミンを添加したPBSを流すことで行った。その結果、純度97%、回収率61%でCD4<sup>+</sup>細胞を回収することができた。

【0026】

【発明の効果】本発明の分離材料や分離方法は、標的物質を選択的に吸着する物質を使用して標的物質を吸着しているため、標的物質への高い選択性が得られることとなる。また、標的物質の変性や機能変化が少ない状態で、外部刺激(環境変化)により簡便に脱離させて回収することが可能となる。その結果、従来困難であった血球系細胞や機能細胞の詳細な分離が容易にできるため、特殊な細胞を分離して、必要により増殖・機能変換させて再び生体内に戻す細胞治療や遺伝子治療に有効な分離技術等として効果を発揮することとなる。また、本分離材料や分離方法は、標的物質を各種のバイオプロダクト、生体関連物質や化学物質とすることで、バイオ産業、医薬品産業、化学工業から診断・治療などの医療分野に至るまで、広範に利用できる技術となる。